

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**Seroprevalencia de anticuerpos IgG contra antígenos  
líticos y latentes del virus herpes humano 8 en  
donantes de sangre que acuden al Centro Médico  
Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”, período  
noviembre 2007 - marzo 2008**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología  
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

**AUTOR**

Diana Sofía Balboa Coronado

**ASESOR**

Pilar Fernanda Alva Betalleluz

Vanda Akiko Ueda Fick de Souza

Lima - Perú

2009

A Dios por haberme bendecido  
con una familia maravillosa

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi sincero agradecimiento a mi asesora y profesora: Pilar Alva Betalleluz, por su rigurosidad en el desarrollo de este estudio, por sus alcances y su amistad.

Al Dr. Salim Mohanna, coordinador del Grupo de Trabajo en Sarcoma de Kaposi y HHV-8, y al Dr. Eduardo Gotuzzo, por su confianza, respaldo y consideración incondicional desde que nació la idea de este estudio.

A la Dra. Vanda Akiko Ueda Fick de Souza y al Dr. Claudio Pannuti, del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y brindado tantas oportunidades.

A mis profesores que contribuyeron en mi formación profesional y que siempre incentivaron la investigación: Blgo. William Cornejo, Lic. TM Segundo León, Lic. TM José Antonio Paredes y Lic. TM Miguel Sandoval.

A mi Promoción Ingresante 2003: Karina, María, Meladith, John A.; Jhon C., Carlos, Jack, Silver, Juan, Sebastián y César, por su amistad y los momentos compartidos a lo largo de toda mi vida universitaria.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	5
SUMMARY .....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. MARCO TEÓRICO .....	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
1. LUGAR DE ESTUDIO.....	21
2. DISEÑO ESTADÍSTICO .....	21
3. MATERIALES .....	23
4. MÉTODOS.....	24
5. ANÁLISIS DE DATOS.....	27
IV. RESULTADOS .....	29
V. DISCUSIÓN.....	43
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	47
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	49
VIII. ANEXOS.....	57
ANEXO 1 .....	58
ANEXO 2 .....	61
ANEXO 3 .....	65

## RESUMEN

El Virus Herpes Humano 8 (HHV-8) es el agente causal del Sarcoma de Kaposi y de otros desórdenes linfoproliferativos que afectan principalmente a individuos inmunocomprometidos; por ello se ha propuesto su detección en donantes de sangre por ser un virus potencialmente oncogénico. El objetivo de este estudio es determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra antígenos líticos y latentes del HHV-8 en donantes de sangre de una zona urbana de Lima.

Se recolectaron 350 muestras de sangre de los donantes admitidos en el Servicio de Medicina Transfusional del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”, de noviembre del 2007 a marzo del 2008, la media de sus edades fue de 33.9 años, siendo el 77.4% de sexo masculino y el 22.6% de sexo femenino. Las muestras de suero se evaluaron mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra antígenos líticos y latentes del HHV-8.

La seroprevalencia fue de 14.0%, 13.3% en la población masculina y 16.5% en la femenina. La más alta seroprevalencia se encontró en el grupo etáreo  $\geq 45$  años, que alcanzó el 22.2%.

Los datos obtenidos indican que la infección por el HHV-8 es altamente prevalente en la población peruana, lo que debe ser verificado en futuros estudios que abarquen mayor número de participantes de diferentes zonas geográficas del país.

**Palabras Clave:** Seroprevalencia, Virus Herpes Humano 8, Población Urbana, Inmunofluorescencia Indirecta.

## SUMMARY

The Human Herpesvirus 8 (HHV-8) is the causal agent of Kaposi's Sarcoma and other lymphoproliferative disorders that affect principally to immunocompromised patients. It has been proposed as an infectious agent to be detected in blood donors because of its oncogenic properties.

The aim of this study is to determine the seroprevalence of IgG antibodies against lytic and latent antigens of HHV-8 in blood donors from urban population from Lima.

Serum samples from 350 blood donors, admitted to the Transfusion Medicine Service from the Naval Medical Center "Cirujano Mayor Santiago Távara" from november 2007 to march 2008, were collected. The mean age was 33.9 years, 77.4% were men and 22.6% were women. The samples were tested by indirect immunofluorescence assay to detect antibodies against lytic and latent antigens of HHV-8.

The seroprevalence was 14.0%, 13.3% in men and 16.5% in women. The seroprevalence was higher in the age group  $\geq 45$  years (22.2%).

The data obtained shows that it is probable that the infection by HHV-8 would be frequent in peruvian population which must be verified in future studies with a bigger population, and from different geographic regions from the country.

**Key Words:** Seroprevalence, Human Herpesvirus 8, Urban Population, Immunofluorescence.

## I. INTRODUCCIÓN

El riesgo de transmisión de agentes infecciosos a través de transfusiones sanguíneas ha motivado continuas investigaciones de posibles agentes infecciosos que podrían ser transmitidos por esta vía y al continuo desarrollo de pruebas de tamizaje que ofrecen mayor eficiencia en la discriminación de donantes.

Desde 1995, muchos agentes infecciosos han surgido como potenciales amenazas de la seguridad de las unidades sanguíneas; estos incluyen al virus de la hepatitis G (HGV), virus SEN (SEN-V) y el virus TT (TTV) los que fueron relacionados con la hepatitis post-transfusional, el virus herpes humano 8 (HHV-8), el coronavirus del síndrome respiratorio agudo, el prion que transmite la enfermedad variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), entre otros; inclusive otros patógenos ya conocidos, como el virus de la hepatitis A, parvovirus B19, enterovirus y leishmania, fueron reevaluados para determinar su posible potencial transmisión (**Blajchman MA, 2006**).

El HHV-8 es el virus herpes humano descubierto más recientemente. Fue por primera vez detectado en células endoteliales linfáticas proliferativas del tumor de piel conocido como Sarcoma de Kaposi (SK); posteriormente fue detectado en células B, monocitos y saliva de pacientes con esta neoplasia **(Hudnall SD, 2004)**. El Sarcoma de Kaposi es la neoplasia más frecuente en personas con SIDA, aproximadamente del 15-20% de estos pacientes desarrollan esta neoplasia que raramente ocurre en individuos inmunocompetentes **(Chang Y, 1994)**. El HHV-8 forma parte de los virus humanos vinculados a desórdenes linfoproliferativos, debido a su presencia en células B malignas del Linfoma de Efusión Primaria (PEL) y en la Enfermedad Multicéntrica de Castleman, entre otros **(Du MQ, 2007)**.

La prevalencia de la infección por el HHV-8 ha sido objeto de múltiples estudios en donantes de sangre y en la población en general, luego de que fue posible aislar al virus a partir de sangre de un donante, lo que representaría un potencial riesgo de transmisión por transfusión sanguínea **(Blackbourn DJ, 1997)**.

La falta de un método bien estandarizado y validado para la determinación de la seroprevalencia del HHV-8 ha conducido a una variabilidad considerable en la seroprevalencia reportada en varios grupos de riesgo de SK y en diferentes regiones geográficas; muchos de los primeros datos de seroprevalencia estuvieron basados en IFI para la detección de anticuerpos contra antígenos latentes del HHV-8, un ensayo que ha demostrado ser menos sensible que el ensayo de IFI para la detección de anticuerpos contra antígenos líticos **(Hudnall SD, 2003)**. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de los ensayos serológicos



disponibles para el HHV-8 no son aún conocidas por la falta de un patrón de oro e individuos infectados y no infectados bien caracterizados para evaluar los ensayos. Es necesario evaluar si las diferencias en los reportes de seroprevalencia son debidas a los ensayos o a la población estudiada (**Pellet PE, 2003**).

En Sudamérica se han llevado a cabo estudios de seroprevalencia en donantes de sangre de zonas urbanas de Brasil, Argentina y Chile, reportándose 2.8%, 4% y 3%, respectivamente (**Pérez C, 2004**). En Brasil, también se reportó 2.5% de seroprevalencia en la población general y 32.6% en hombres homosexuales (**Souza VAUF, 2004**). Sin embargo, la seroprevalencia en población amerindia de Brasil alcanzó el 53.0%, en esta población a su vez se identificó un nuevo subtipo del HHV-8, el subtipo E (**Biggar R, 2000**). El único estudio en el Perú de seroprevalencia del HHV-8 en donantes, determinó una seroprevalencia del 56.3%, cifra comparable con los valores obtenidos en África y en población amerindia sudamericana. Este estudio se realizó en población de Huaral, cuya población representa población rural de este país (**Mohanna S, 2007**).

No se ha determinado aún si el HHV-8 puede ser transmitido por vía parenteral, se han llevado a cabo estudios de seroconversión en receptores de unidades de sangre con serología positiva para el virus con resultados controversiales. La transmisión podría depender de la fracción sanguínea que es transfundida, por la presencia de componentes celulares que son los que pueden mantener viable al virus. Los que reciben transfusiones sanguíneas, sean transplantados o en general inmunosuprimidos son los que se encuentran en riesgo de desarrollar complicaciones de la infección

por el HHV-8, que no ocasiona serias consecuencias en individuos inmunocompetentes. Es así que la transmisión por vía sanguínea del HHV-8 es una posibilidad que debe ser considerada en países con alta endemicidad (**Dollard SC, 2005; Hladik W, 2006**).

El presente estudio tiene como objetivo determinar la seroprevalencia del HHV-8 en donantes de sangre que acuden al Servicio de Medicina Transfusional del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”, ubicado en una zona urbana del departamento de Lima.

## II. MARCO TEÓRICO

El Herpesvirus asociado a Sarcoma de Kaposi (KSHV), denominado Virus Herpes Humano 8 (HHV-8), fue identificado en el año 1994 de las lesiones características del Sarcoma de Kaposi (KS) que es una de las enfermedades oportunistas características asociadas al SIDA (**Chang Y, 1994**). Existen cuatro variedades clínico-epidemiológicas de Sarcoma de Kaposi; el KS Clásico ocurre frecuentemente en individuos de edad avanzada, los nódulos se presentan en las extremidades y el progreso es lento con raro compromiso de órganos internos; el SK Endémico o Africano se caracteriza por el compromiso de nódulos linfáticos; el SK Iatrogénico se relaciona a la inmunosupresión inducida por fármacos, aunque una reducción o detención de la ingesta de éstos, frecuentemente lleva a la remisión de las lesiones; finalmente el SK Epidémico o asociado a SIDA es una forma agresiva de la enfermedad, con una sobrevida de los pacientes de sólo semanas después de aparecido los síntomas (**Teo CG, 2006**). Las células del huso, células características y

probablemente tumorales de esta neoplasia, son de origen desconocido aunque podrían derivar de una célula precursora multipotente de células hematopoyéticas y endoteliales; en las lesiones tempranas del KS solo alrededor del 10% de las células de huso y endoteliales son positivas para el HHV-8, esto sugiere que mecanismos paracrinos estarían vinculados a la progresión de la enfermedad, ya que en las lesiones nodulares más tardías cerca del 90% de las células del huso contienen al virus sugiriendo que la infección por él les proporciona una ventaja de crecimiento; al inicio el SK es una hiperplasia policlonal que desarrolla hacia una verdadera malignidad clonal a medida que la enfermedad progresa **(Jenner RG, 2002)**. El HHV-8 no solamente está asociado a SK sino es un virus directamente asociado con desórdenes linfoproliferativos como la enfermedad Multicéntrica de Castleman y el Linfoma de Efusión Primaria (PEL), además, el virus fue identificado en linfomas sólidos, frecuentemente extranodulares con características morfológicas e inmunofenotípicas características y similares a los del PEL, como también en otros desórdenes linfoproliferativos con presentaciones clínico-patológicas heterogéneas **(Du MQ, 2007)**.

La familia Herpesviridae está subdividida en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, y *Gammaherpesvirinae*; a la subfamilia de los Alphaherpesvirus pertenecen el Virus Herpes Simple 1 (HHV-1), el Virus Herpes Simple 2 (HHV-2) y el Virus Varicella-Zoster (HHV-3); a la subfamilia de los Betaherpesvirus pertenecen el Citomegalovirus (HHV-5), el Virus Herpes Humano 6 (HHV-6) y el Virus Herpes Humano 7 (HHV-7); finalmente a la subfamilia de los Gammaherpesvirus pertenecen dos géneros,

los gamma-1 o Lymphocryptovirus (LCV), y los gamma-2 o Rhadinovirus (RDV). El virus Epstein-Barr (HHV-4) es el único LCV y el HHV-8 es el único RDV descubierto en humanos (**Edelman DC, 2005**).

El HHV-8 posee un núcleo central de ADN de doble hebra, el cual es lineal en la cápside viral pero al infectar a la célula hospedera y liberarse de su cápside, se circulariza (**Renne R, 1996**). Se presume que los sitios de circularización del ADN del virus son las regiones repetidas terminales ricas en G+C, que flanquean la región codificante que son las 90 regiones abiertas de lectura (ORF) identificadas, que han sido enumeradas de acuerdo a la nomenclatura del Virus Herpes Saimiri (HVS), el otro Rhadinovirus (**Russo JJ, 1996**). Las ORFs únicas para el HHV-8 fueron enumeradas como K1-K15 aunque posteriormente se encontró homólogos al K8 y K13, como también ORF únicos adicionales (K4.1, K4.2, K8.1, K10.1, K10.5, K10.7, K11.1 y K14.1) que han sido incluidos (**Jenner RG, 2002**). El genoma del HHV-8 está conformado aproximadamente por 165 a 170 kb, el cual es ligeramente mayor al del Virus Herpes Simple 1 de 153 kb, pero significativamente menor al del Citomegalovirus que posee 230 kb; el genoma se encuentra dentro de una cápside icosaédrica de 12 pentonas y 150 hexonas interconectadas por 320 tripletes, los componentes estructurales o capsómeros se organizan con una Triangulación de 16 en cada una de las veinte superficies icosaédricas triangulares (**Wu L, 2000**). Para construir un icosaedro a partir de proteínas se requiere de que al menos haya tres proteínas en cada una de las veinte superficies, es decir ser requerirían de al menos 60 subunidades en total (3x20), es por ello

que la mayoría de los virus están constituidos por un número de subunidades igual a un múltiplo de 60 o a T veces 60, donde el número T (Triangulación) indica el número de subunidades en cada una de las unidades icosaédricas asimétricas **(Zlotnick A, 2004)**. Entre la cápside y la envoltura está el tegumento, un material proteico y amorfo cuyo espesor varía de acuerdo a su localización en la célula y al tipo de herpesvirus; la envoltura es de apariencia trilaminar derivado de las membranas celulares, posee abundantes y cortas protrusiones glucoproteicas diferentes a las de otros virus **(Edelman DC, 2005)**.

El HHV-8 para establecer una infección persistente en el hospedero, adopta uno de sus dos programas genéticos alternativos, el programa latente le brinda una persistencia relativamente estable e inmunológicamente silenciosa, mientras que el programa lítico permite liberar viriones y poder ser transmitidos a nuevos hospederos **(Coscoy L, 2007)**. En la fase latente del virus, la expresión génica se restringe a genes que codifican proteínas responsables de mantener el ADN viral, inmortalizar la célula y contribuir a la resistencia del ataque inmunológico, es así que la expresión de estos genes puede promover el desarrollo de tumores; en la fase lítica del virus, la célula infectada que es productora de virus usualmente muere, aunque la expresión de genes antiapoptóticos del virus prolonga la vida de estas células para incrementar el número de virus liberados al medio extracelular, como consecuencia, los antígenos líticos pueden también promover la formación de tumores **(Yarchoan R, 2006)**. En su fase latente el HHV-8 se encuentra en el núcleo de la célula hospedera como un episoma circular cerrado de ADN que es copiado por la maquinaria

de replicación de ADN del hospedero durante la división celular, así, durante la mitosis el antígeno nuclear latente (LANA-1) ancla el ADN por sus secuencias repetidas terminales a la histona H1 de la cromatina del hospedero. Los genes expresados en todas las células infectadas son la ORF73 que codifica el LANA-1, la ORF72 que codifica la ciclina viral y la ORF71 que codifica el FLIP viral (proteína inhibidora del dominio de muerte asociado a Fas). El LANA-1 se une a la proteína del Retinoblastoma (pRB), a la p53 y se vincula directamente a la expresión génica; la ciclina viral cumple roles similares a las ciclinas del hospedero aunque no es posible inactivarla por lo que fosforila a la pRB y a la Bcl-2 haciendo que progrese la división celular y que se bloquee la apoptosis. La ORF50 es el transactivador de la replicación lítica del HHV-8, cuyo promotor está altamente metilado en células infectadas con el virus en su fase latente, codifica al RTA que es necesario y suficiente para activar todo el ciclo lítico, además es capaz de activar a su propio promotor originando un incremento autocatalítico de expresión (**Jenner RG, 2002**). Los micro ARNs (miRNAs) son una clase de pequeños ARNs propuestos como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica, el pequeño tamaño de los precursores de los miRNA los hace potencialmente ideales para el uso por los virus como inhibidores de las vías de defensa del hospedero, el HHV-8 codifica un arreglo de 11 distintos miRNAs lo que son expresados a niveles detectables en las células infectadas con el virus en su fase latente (**Cai X, 2005**). La fase de replicación lítica del HHV-8 tiene dos funciones fundamentales, producción de viriones y la inhibición de la respuesta anti-viral del hospedero, la mayoría de estos genes provienen de los genes del hospedero cuyos productos actúan de forma no autónoma, afectando a las

células vecinas o inhibiendo la señalización intracelular (**Jenner RG, 2002**). El principal mecanismo de evasión inmunitaria es el estimular una respuesta dependiente de la subpoblación CD4<sup>+</sup> Th2, ya que la subpoblación de células CD4<sup>+</sup> Th1 es fundamental para llevar a cabo óptimas respuestas celulares contra patógenos intracelulares y respuestas inmunes antivirales, mientras que la subpoblación CD4<sup>+</sup> Th2 promueve respuestas de inmunidad humoral contra patógenos extracelulares; el incremento o estímulo de una subpoblación puede suprimir el desarrollo o actividad de la otra, es por ello que el HHV-8 promueve respuestas dependientes de células Th2 como mecanismo de evasión a expensas de las células Th1. Entre los principales antígenos producidos en esta fase se encuentran, los factores virales reguladores de los interferones (vIRF1, vIRF2, vIRF3), que inhiben la transcripción de los interferones de tipo I, IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ , que son inducidos directamente por la infección viral de las células y representan la primera línea de defensa contra virus de la inmunidad innata. Para protegerse del ataque del complemento, la ORF4 del HHV-8 codifica proteínas reguladoras solubles del complemento, denominadas proteínas de control del complemento de HHV-8, con función similar a los reguladores de la activación del complemento de las células. La ORFK3 y ORFK5 codifican dos proteínas denominadas moduladoras del reconocimiento inmune (MIR 1 y MIR2), que incrementan la endocitosis de las moléculas del MHC tipo I para ser degradadas, de esta forma se bloquea la presentación de antígenos (**Rezaee SAR, 2006**). La vIL6, codificada por la ORFK2, está involucrada en la regulación de la hematopoyesis, inflamación y oncogénesis, la IL6 requiere de la IL-6R (receptor de IL-6) y la gp130 como receptores en la superficie de la célula, la gp130 se



encuentra en diferentes células y la requieren diferentes citocinas, mientras que la IL-6R está restringida a los hepatocitos y algunos leucocitos, de esta forma se limita la acción de la IL6, pero la vIL6 no requiere de la expresión de la IL-6R en la superficie de la célula sino puede hacerlo a través de la forma soluble del receptor y así unirse directamente. Existen otras proteínas de la fase lítica del HHV-8, las que no actúan solas sino en concierto con otras, para así lograr una infección, latencia, reactivación y replicación óptimas **(Coscoy L, 2007)**.

La infección causada por el HHV-8 es persistente, con reactivaciones periódicas durante las cuales el virus puede circular en los leucocitos de sangre periférica y ser transmitido por transfusión sanguínea, si esto ocurre, hay un riesgo potencial de desarrollar Sarcoma de Kaposi u otros desórdenes linfoproliferativos, si el receptor es inmunosuprimido **(Blajchman MA, 2006)**. Además, es posible que pueda haber susceptibilidad genética al desarrollo de SK que combinado con la infección por el HHV-8, inicie la patogénesis de la enfermedad, sin embargo, aún no se han dado asociaciones significativas **(Angeloni A, 2006)**. El ADN del HHV-8 ha sido amplificado a partir de células mononucleares de sangre periférica de individuos VIH positivos, lo que anticipa un posible desarrollo de SK; el HHV-8 también puede ser demostrado en otras células hematopoyéticas principalmente en el linfocito B que aparentemente hospeda al virus en su fase latente **(Corey L, 2002)**. Aún es controversial si el HHV-8 puede ser transmitido por transfusión sanguínea; la transmisión de este virus por esta vía puede estar limitada a la naturaleza del virus de ser patógeno intracelular, pero se ha demostrado baja frecuencia del virus

circulante en personas seropositivas asintomáticas, de todos modos la transmisión por transfusión sanguínea es un posible riesgo que debe ser considerado en países con alta endemicidad **(Hladik W, 2006)**. Algunas posibles medidas que pueden reducir el riesgo de transmisión del HHV-8 son la detección de anticuerpos contra él en todos los donantes o en los donantes cuyas unidades estén dirigidas a pacientes inmunocomprometidos, como también la reducción leucocitaria universal o reducción leucocitaria de unidades de glóbulos rojos y plaquetas destinadas a pacientes inmunocomprometidos **(Blajchman MA, 2006)**.

La seroprevalencia del HHV-8 no es uniforme en la población mundial, como es el caso de los otros virus herpes humanos sino varía de acuerdo a la región geográfica, encontrándose una seroprevalencia en relación inversa a la condición socioeconómica **(Mohanna S, 2005a)**. La detección de anticuerpos contra el HHV-8 es dependiente de las características del ensayo usado, los ensayos de inmunofluorescencia para detección de anticuerpos contra antígenos latentes han demostrado no ser ideales para determinar la seroprevalencia del HHV-8 por los bajos títulos de anticuerpos reportados en personas infectadas asintomáticas, sin embargo, los ensayos de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos contra antígenos líticos han conseguido determinar mayor número de positivos **(Hudnall S, 2004)**. La especificidad y la sensibilidad de los ensayos, empleados hasta el momento, aún no están determinadas por la falta de una “prueba de oro” y una buena caracterización de pacientes infectados y no infectados **(Pellet PE, 2003)**.

La población con la más alta seroprevalencia para el HHV-8 es la de hombres homosexuales, que supera hasta por seis veces la observada en individuos heterosexuales, por ello, se supone que de alguna manera la transmisión heterosexual es menos efectiva **(Martin JN, 2007)**. Por esta evidencia, se hipotetizó que el HHV-8 podía ser transmitido sexualmente, además, los comportamientos sexuales asociados con la seropositividad para el HHV-8 incluyen el número de parejas sexuales, el número de parejas con SK y parejas sexuales infectadas por VIH, pero no se ha definido que prácticas sexuales serían de riesgo. Sin embargo, estudios en secreciones genitales y mucosas para detectar al HHV-8 tanto en hombres como en mujeres no ha definido consistentemente que la transmisión sea por vía genitourinaria **(Corey L, 2002)**.

En el Perú, se ha determinado una incidencia de Sarcoma de Kaposi de 2.54 por 10000 pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), sin embargo, esta cifra podría no estar representando la incidencia real de SK ya que sólo se consideran los casos atendidos en este nosocomio **(Mohanna S, 2005b)**. La presentación clínica de sarcoma de Kaposi clásico descrita en el Perú, de nódulos exofíticos y lesiones erosionadas, es similar a la observada en Colombia la que a su vez se asemeja a la encontrada en comunidades africanas **(Mohanna S, 2006)**. El único reporte de seroprevalencia de anticuerpos contra antígenos líticos del HHV-8 en donantes de sangre en el Perú, llevado a cabo en Huaral, indica una seroprevalencia de 56.25%, cifra que ha sido reportada en poblaciones africanas y en población amerindia en Sudamérica **(Mohanna S, 2007)**. El reporte podría estar representando la seroprevalencia de donantes de una zona

rural del Perú, mientras que aún no se conoce la seroprevalencia en una zona urbana, como Lima, en la que se concentra la mayor cantidad de donantes, por este motivo, el objetivo de este estudio es determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra antígenos líticos y latentes del HHV-8 en donantes de sangre que acuden al Servicio de Medicina Transfusional del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” que representaría el primer estudio de seroprevalencia en población urbana en el Perú.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. LUGAR DE ESTUDIO**

El presente estudio descriptivo retrospectivo de corte transversal, se llevó a cabo en el Servicio de Medicina Transfusional del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”, ubicado en Av. Venezuela s/n Bellavista, durante el periodo comprendido entre noviembre del 2007 y marzo del 2008.

#### **2. DISEÑO ESTADÍSTICO**

##### **2.1. Tamaño de Muestra**

Tamaño de muestra para estimar proporción (**Bejarano L, 2006**):

$$n = \frac{z^2 * P(1 - P)}{E^2}$$

Como porcentaje estimado de la muestra se tomó como referencia la seroprevalencia de 56.25% de anticuerpos IgG contra antígenos líticos del HHV-8 en donantes de sangre de Huaral (**Mohanna S, 2007**), con un nivel de confianza de 95% y un error máximo aceptable de 5%. El tamaño de muestra resultante (n=350) representa el número mínimo de donantes a evaluarse.

## **2.2. Población y Muestra**

La población en estudio la constituyen donantes de sangre entre 18 y 55 años de edad, de ambos sexos, considerados aptos para la donación luego de haberse determinado su hematocrito y su grupo sanguíneo, haber sido pesados, entrevistados y no haber reportado conducta sexual de riesgo, historia de infecciones, medicamentos, entre otras condiciones que podrían resultar de riesgo para el receptor de la unidad sanguínea, y en general los donantes aptos presentaron un estado de salud óptimo al momento de ser admitidos en el Servicio de Medicina Transfusional del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”.

La muestra la conformaron 350 donantes de sangre que fueron todos los que acudieron al lugar de estudio entre noviembre del 2007 y marzo del 2008. La edad, sexo, lugar de nacimiento y procedencia de cada donante fue obtenida de la Ficha de Entrevista: Selección del Postulante a Donación de Sangre (**ANEXO 1**) en el que a su vez el donante firmó el Consentimiento Informado, en el que

acepta que su sangre sea examinada para la presencia de anticuerpos contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana y otras enfermedades infecciosas.

### **3. MATERIALES**

Los materiales utilizados para la detección de anticuerpos IgG contra antígenos líticos y latentes del HHV-8 fueron:

- Tubos sin aditivo de 6mL.
- Crioviales de 1.5mL.
- Centrífuga de 5000rpm.
- Congeladora a -20 °C.
- Cabina de Flujo Laminar Tipo II.
- Agitador.
- Estufa a 37 °C.
- Estufa a 37°C de CO<sub>2</sub>.
- Microscopio invertido.
- Microscopio de fluorescencia.
- Micropipetas simples y multicanales.
- Puntas para micropipetas descartables.
- Frascos de cultivo celular.
- Láminas para inmunofluorescencia.

Los reactivos utilizados para la detección de anticuerpos IgG contra antígenos líticos y latentes del HHV-8 fueron:

- Anti-IgG humano policlonal de conejo conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (Dako Denmark).
- Control Positivo: Pool de sueros positivos para anticuerpos IgG contra antígenos líticos y latentes del HHV-8 de

pacientes con Sarcoma de Kaposi Clásico, cuyos títulos de anticuerpos contra cualquiera de los dos tipos de antígenos del virus fueron superiores a 640.

- Control Negativo: Suero de neonatos negativos con madres negativas para anticuerpos IgG contra antígenos líticos y latentes del HHV-8.

La línea celular utilizada como sustrato para la Inmunofluorescencia Indirecta fue la BCBL-1 (del inglés Body Cavity Based Lymphoma), la que se encuentra infectada únicamente con el HHV-8 que a condiciones óptimas del cultivo celular se mantiene en su fase latente. El Cultivo celular fue mantenido 37°C en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina y estreptomicina (**ANEXO 2**).

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Colección y Procesamiento de Muestras**

Las muestras de sangre obtenidas por punción venosa, se colectaron en tubos sin aditivo de 6mL, las que fueron centrifugadas posteriormente a 3000rpm durante 5 minutos para obtener el suero de cada una de ellas. El suero de cada muestra fue transferido a 2 crioviales de 1.5mL cada uno, uno de ellos fue conservado a -20°C hasta su uso para la prueba de IFI para la detección de Anticuerpos contra antígenos líticos y latentes del HHV-8 y el otro fue utilizado para las pruebas sexológicas de rutina de los Servicios de Medicina Transfusional Tipo II del Perú (VIH, HTLV, HCV, HBVc, HBVs Ag, Chagas y Sífilis).



## **4.2. Inducción de la Replicación Lítica del HHV-8 en la línea celular BCBL-1 (ANEXO 2)**

La línea celular BCBL-1 expresa los antígenos de la fase latente del HHV-8. El cultivo celular fue tratado con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) a una concentración final de 20ng/mL para inducir la replicación viral y la expresión de antígenos de su fase lítica; ésta expresión es máxima a las 96 horas de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (Souza VAUF, 2004).

## **4.3. Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para la Determinación de Anticuerpos contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 (ANEXO 3)**

### **4.3.1. Preparación del Sustrato para la IFI**

- Las células BCBL-1, expresando los antígenos de la fase lítica o latente del HHV-8, fueron concentradas y lavadas tras 2 centrifugaciones consecutivas a 1200rpm durante 5 minutos cada una.
- Se resuspendieron las células en PBS hasta una concentración final del  $10 \times 10^6$  células/mL.
- En cada pozo de las láminas para IFI se adicionó 10uL de suspensión de células, se dejaron secar y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

### **4.3.2. Procedimiento de la Prueba de IFI**

- Las láminas para inmunofluorescencia con el sustrato, células BCBL-1, conservadas a -20°C

fueron fijadas en acetona a la misma temperatura por 10 minutos, y luego secadas a temperatura ambiente.

- El Diluyente fue PBS con 1% de leche descremada. Todas las muestras y el Control Negativo se diluyeron 1/40. El Control Positivo se diluyó 1/40, 1/160, 1/640, 1/2560 y 1/10240.
- El Diluyente hidrató al sustrato adherido en las láminas para IFI (células BCBL-1) durante 5 minutos y fue absorbido.
- Se adicionó 20uL de las diluciones de muestras y controles a cada pozo. Se incubó a 25°C por 30 minutos y se lavó con PBS.
- El conjugado, Anti-IgG humano policlonal de conejo conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína fue diluido 1/40 en azul de Evans, y posteriormente se adicionó 20ul por cada pozo de la lámina. Se mantuvo a 25°C en oscuridad por 30 minutos, se lavó en PBS y se dejó secar en oscuridad.
- Se adicionó glicerol tamponado y se cubrió la lámina con un cubreobjetos.

#### **4.3.3. Lectura e Interpretación**

La lectura se realizó en un Microscopio de Fluorescencia con objetivo de 40x, considerándose positivo las reacciones con las siguientes características:

- IFA positiva para anticuerpos contra antígenos latentes del HHV-8: Punteado nuclear fluorescente en las células BCBL-1.
- IFA positiva para anticuerpos contra antígenos líticos del HHV-8: Fluorescencia en toda la célula BCBL-1.
- IFA negativas para anticuerpos contra antígenos latentes o líticos del HHV-8: Células BCBL-1 opacas y de color rojo.

## 5. ANÁLISIS DE DATOS

### 5.1. Seroprevalencia

La seroprevalencia de anticuerpos IgG contra antígenos líticos y latentes del HHV-8 en donantes de sangre que acuden al Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” se estimó mediante la fórmula (**Daniel, 1996**):

$$p = \frac{n^{\circ} \text{ positivos}}{n^{\circ} \text{ total}} \times 100$$

### 5.2. Intervalo de Confianza

Se estimó mediante la siguiente fórmula (**Daniel, 1996**):

$$IC = P \pm Z \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

Donde:

- p = Prevalencia

- $q = 1-p$
- $Z = \text{Nivel de Confianza (95\%)}$
- $N = \text{Tamaño muestral}$

### 5.3. Análisis de Variables

Se evaluó la asociación de las variables edad y sexo con la tasa de infección mediante la Prueba de Chi-cuadrado, según la fórmula:

$$x^2_c = \sum_{i=1}^K \left[ \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \right]$$

Grado de libertad:  $gl = (F-1)(C-1)$

Decisión:

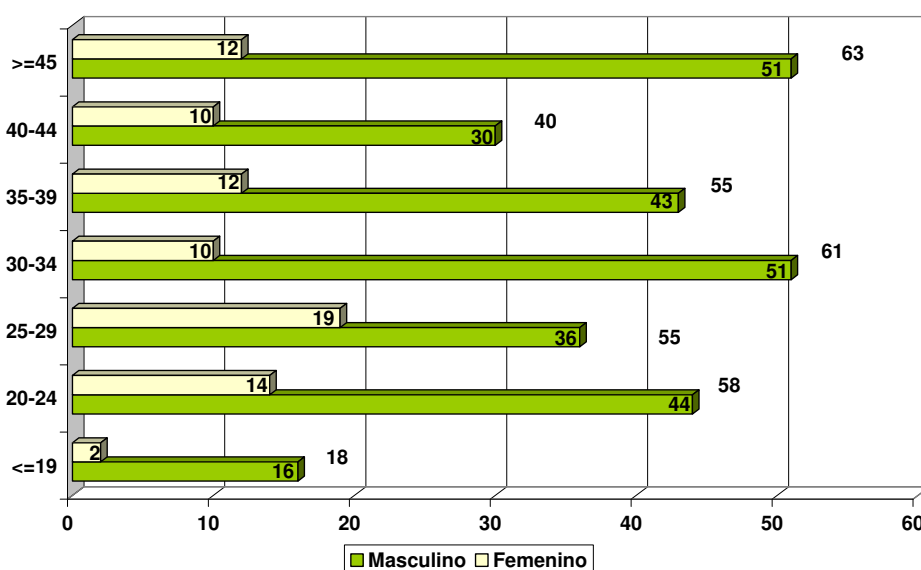
- Si:  $x^2_c > x^2_t$ , entonces existe asociación estadística significativa.
- $x^2_c < x^2_t$ , entonces no existe asociación estadística significativa.

Los datos recolectados fueron procesados y analizados en el paquete estadístico SPSS 16 para Windows.

## **IV. RESULTADOS**

Se recolectaron muestras de suero de 350 donantes de sangre admitidos en el Servicio de Medicina Transfusional del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” entre Noviembre del 2007 a Marzo del 2008, siendo 77.4% ( $n_{\text{masculino}}=271$ ) de sexo masculino y 22.6% ( $n_{\text{femenino}}=79$ ) de sexo femenino, con edades que fluctúan entre los 18 y 55 años de edad, en cada grupo etáreo definido, predominó notablemente el número de donantes de sexo masculino en relación con las donantes de sexo femenino (**FIGURA 1**).

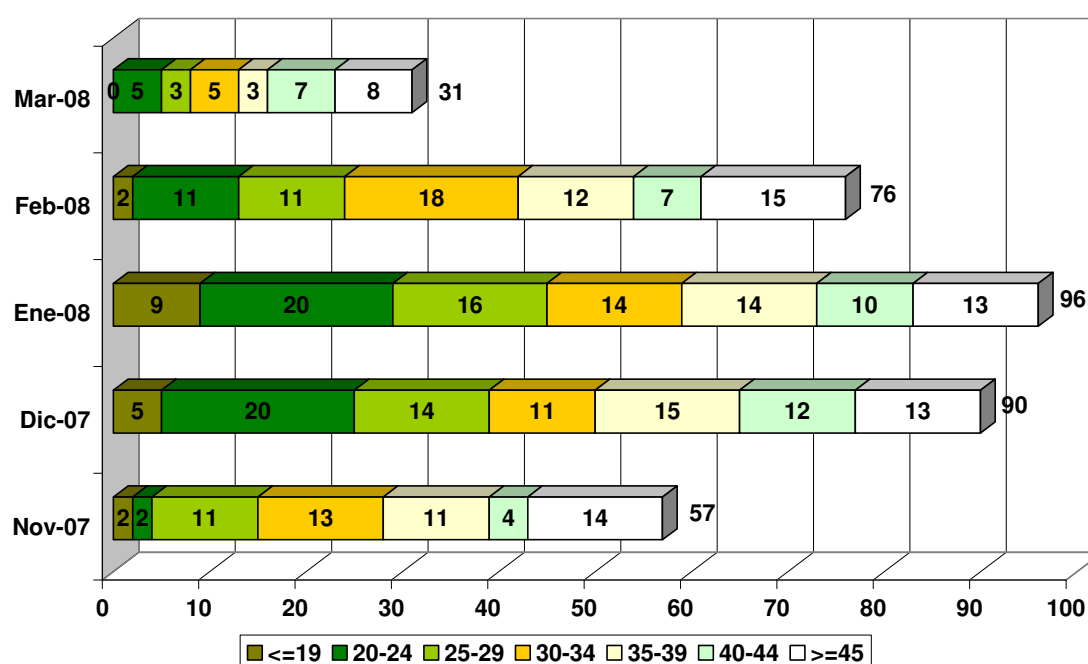
**FIGURA 1: Donantes admitidos según Grupo Etáreo y Sexo entre Noviembre del 2007 a Marzo 2008, Servicio de Medicina Transfusional CMN "CMST"**



**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

La media de las edades fue de 33.9, observándose una proporción de participantes semejante en cada grupo etáreo definido (11.4%-18.0%), en cada mes en que se realizó el estudio (**FIGURA 2**), excepto el del grupo etáreo con edad igual o menor a 19 años que sólo fueron 18 (5.1%) del total de participantes en el estudio (**FIGURA 1**).

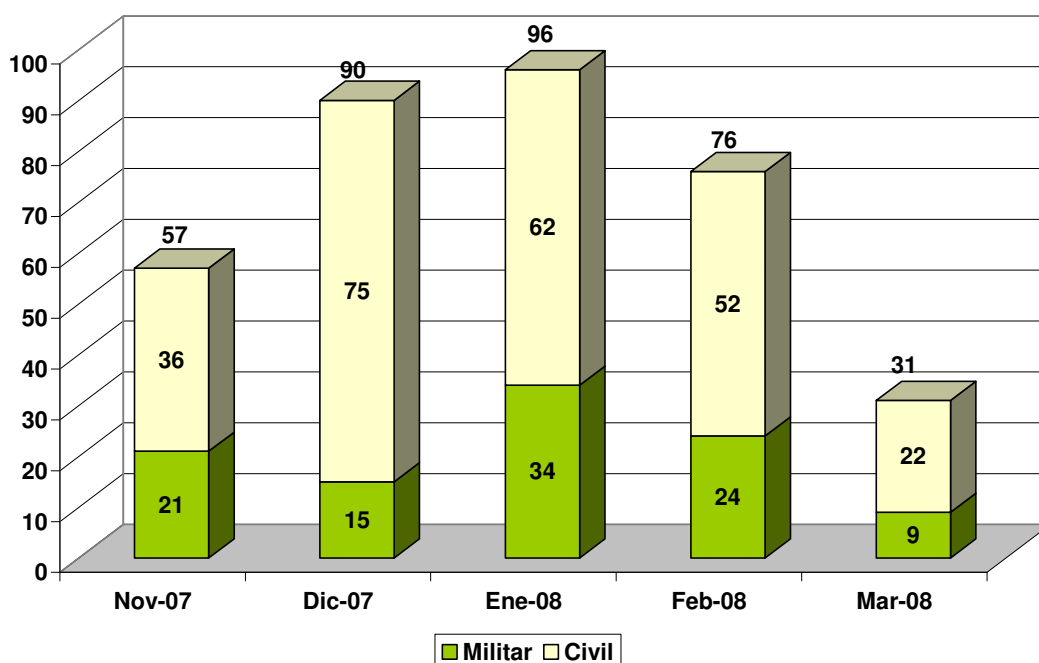
**FIGURA 2: Donantes admitidos según Grupo Etáreo entre Noviembre 2007 a Marzo 2008, Servicio de Medicina Transfusional del CMN "CMST"**



**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN "CMST", Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

Además, se puede apreciar que la proporción de donantes militares fue del 29.4% (103/350), y de civiles del 70.6% (247/350), proporciones que no muestran variaciones significativas durante los meses que abarcó el estudio (**FIGURA 3**).

**FIGURA 3: Donantes admitidos según condición de Civil o Militar entre Noviembre 2007 a Marzo 2008, Servicio de Medicina Transfusional del CMN "CMST"**



**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN "CMST", Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.



En el presente estudio, se determinó una seroprevalencia del 14.0% (49/350), encontrándose presencia de anticuerpos contra antígenos líticos y latentes al mismo tiempo, sólo en el 3.7% (13/350) de los donantes. La prueba que detectó mayor número de casos positivos fue el de Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos contra antígenos latentes del HHV-8 (**TABLA 1**).

**TABLA 1: Comparación de resultados obtenidos entre IFI para detección de Anticuerpos Anti-Antígenos Líticos y el de detección de Anticuerpos Anti-Antígenos Latentes del HHV-8**

		<b>Anticuerpos Anti-Antígenos Líticos del HHV-8</b>		<b>TOTAL</b>
		<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	
<b>Anticuerpos Anti-Antígenos Latentes del HHV-8</b>	<b>Negativo</b>	301	10	311
	<b>Positivo</b>	26	13 (3.7%)	39 (11.1%)
<b>TOTAL</b>		327	23 (6.6%)	350

**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN "CMST", Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

En cuanto a seroprevalencia por grupo etáreo, se observó una mayor seroprevalencia (22.2%) entre donantes con edad igual o mayor a 45 años (**TABLA 2**).

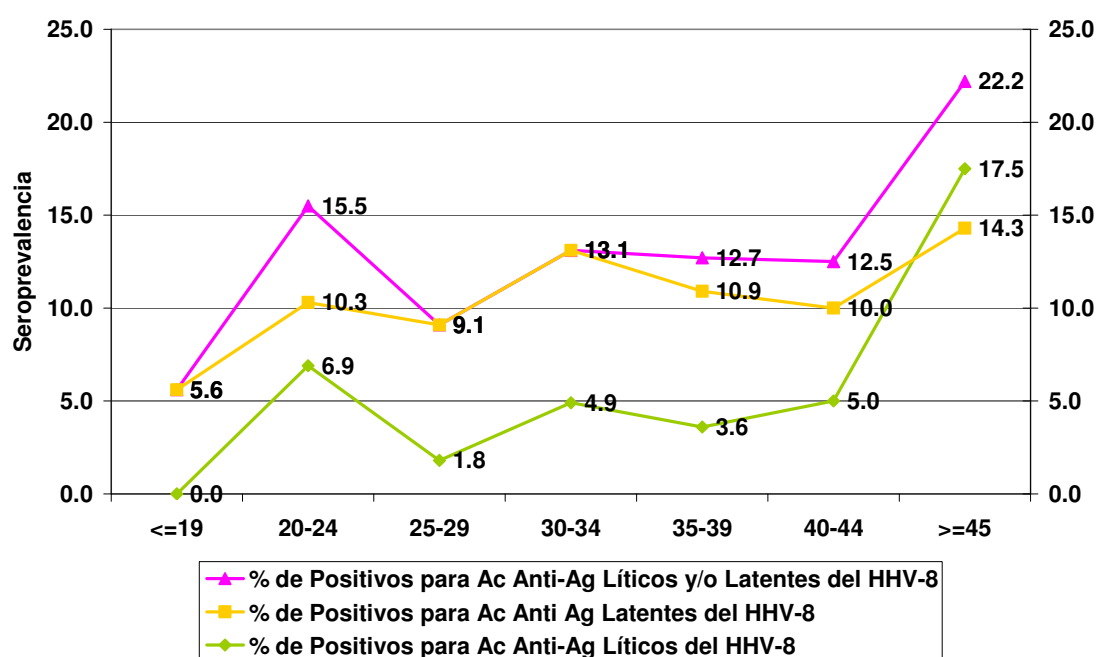
**TABLA 2: Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra el HHV-8 según Grupo Etáreo**

<b>Grupo Etáreo</b>	<b>Nº de donantes</b>	<b>Nº de positivos</b>	<b>Seroprevalencia %</b>	<b>± IC (95%)</b>
<=19	18	1	5.6	10.97
20-24	58	9	15.5	9.43
25-29	55	5	9.1	7.56
30-34	61	8	13.1	8.44
35-39	55	7	12.7	8.89
40-44	40	5	12.5	10.42
>=45	63	14	22.2	10.23
<b>TOTAL</b>	<b>350</b>	<b>49</b>	<b>14.0</b>	<b>3.64</b>

**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

En cada grupo etáreo la prueba que detectó mayor porcentaje de positivos fue también el de Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos contra antígenos latentes, sólo encontrándose un mayor porcentaje con Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos contra antígenos líticos en el grupo etáreo con edad mayor o igual a 45 años, aunque no estadísticamente significativa (**FIGURA 4**).

**FIGURA 4: Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y/o Latentes del HHV-8 según Grupo Etáreo**



**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

La seroprevalencia de anticuerpos IgG contra el HHV-8 en las donantes de sexo femenino superó a la observada en los donantes de sexo masculino, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (**TABLA 3**).

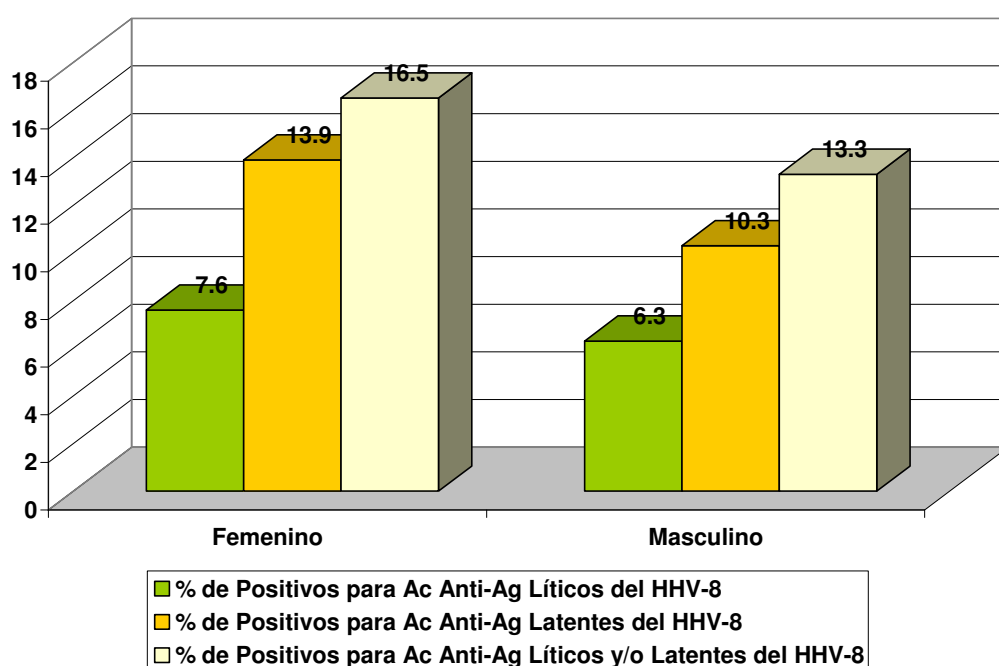
**TABLA 3: Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra el HHV-8 según Sexo**

Sexo	Nº de donantes muestreados	Nº de positivos	Seroprevalencia %	± IC (95%)
Femenino	79	13	16.5	8.28
Masculino	271	36	13.3	4.00
<b>TOTAL</b>	<b>350</b>	<b>49</b>	<b>14.0</b>	<b>3.64</b>

**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

Tanto en donantes de sexo femenino como en donantes de sexo masculino, la prueba que detectó mayor porcentaje de positivos fue el de Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos contra antígenos latentes (**FIGURA 5**).

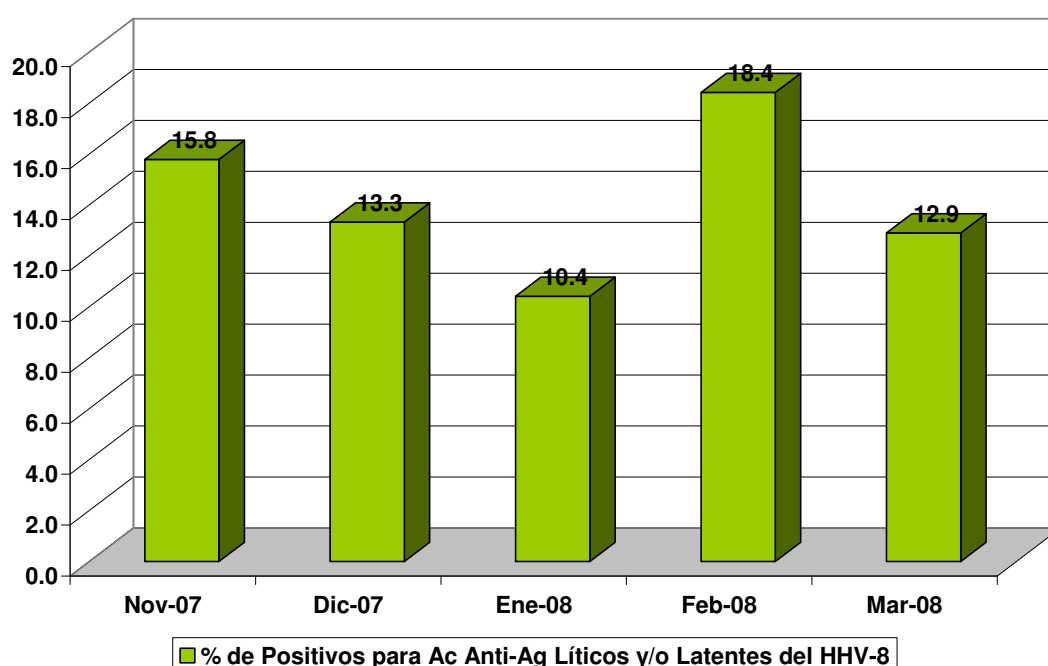
**FIGURA 5: Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y/o Latentes del HHV-8 según Sexo**



**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

Durante los meses que abarcó el estudio, la seroprevalencia por mes fue similar a la total, cada uno de ellos recae dentro del intervalo de confianza (12.24%-15.75%) (**FIGURA 6**).

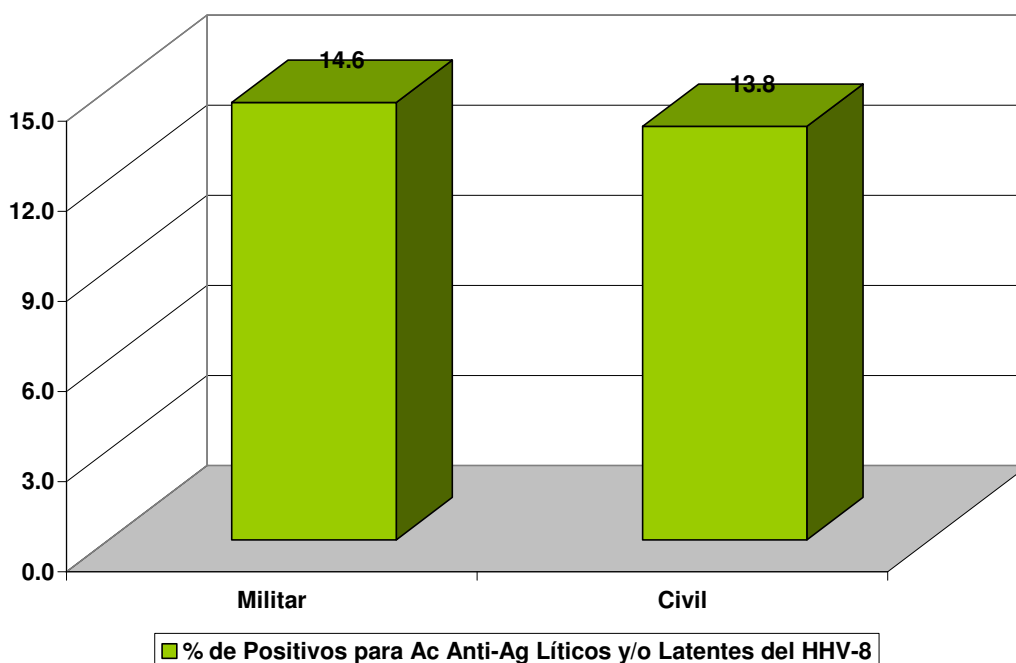
**FIGURA 6: Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y/o Latentes del HHV-8 por mes, de Noviembre 2007 a Marzo 2008**



**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN "CMST", Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

Entre los donantes militares y civiles, no se observó diferencia significativa en cuanto a la seroprevalencia encontrada en cada grupo (**FIGURA 7**).

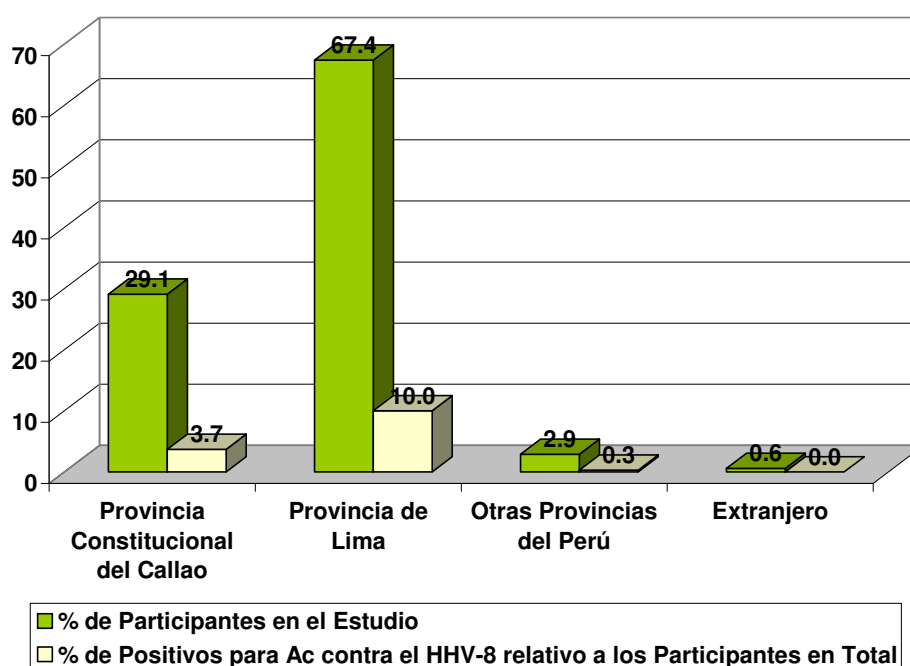
**FIGURA 7: Seroprevalencia de Anticuerpos contra el HHV-8 según condición de Militar o Civil**



**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

Con respecto al total de participantes en el estudio, el 67.4% (236/350) fueron provenientes de la provincia de Lima, los que a su vez constituyeron la mayor parte del número de casos positivos encontrados (35/350) (**FIGURA 8**).

**FIGURA 8: Porcentaje de Participantes por Procedencia y Porcentaje de Positivos con respecto al Total de Participantes**



**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.



Las seroprevalencias en ambos sexos y en cada grupo etáreo, son esencialmente las mismas, no encontrándose relación estadísticamente significativa entre la positividad para anticuerpos contra antígenos líticos y/o latentes del HHV-8 y el sexo o la edad del donante de sangre ( $\alpha=0.05$ ) (**TABLA 4**).

**TABLA 4: Prueba de Independencia entre la Positividad para Anticuerpos contra el HHV-8 y las Variables Sexo y Edad**

<b>Variables</b>	<b>Valor Chi-cuadrado</b>	<b>p</b>
Sexo	0.511	0.475
Edad	6.004	0.423

**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

Existe relación estadísticamente significativa entre la positividad para anticuerpos contra antígenos líticos del HHV-8 y los diferentes grupos étnicos ( $\alpha=0.05$ ), sin embargo, la positividad para anticuerpos contra antígenos latentes del HHV-8 no es estadísticamente diferente en cada uno de ellos ( $\alpha=0.05$ ) (**TABLA 5**).

**TABLA 5: Prueba de Independencia entre Edad y la Positividad para Anticuerpos contra Antígenos Latentes o Líticos del HHV-8**

Variables	Valor Chi-cuadrado	p
Anticuerpos contra antígenos latentes del HHV-8	1.763	0.940
Anticuerpos contra antígenos líticos del HHV-8	16.671	0.011

**FUENTE:** Seroprevalencia de Anticuerpos IgG contra Antígenos Líticos y Latentes del HHV-8 en Donantes de Sangre que acuden al CMN “CMST”, Período Noviembre 2007 – Marzo 2008.

## V. DISCUSIÓN

Desde que hubo evidencia de una posible transmisión del HHV-8 por transfusión sanguínea (**Blackbourn DJ, 1997**), se han llevado a cabo muchos estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones, quedando demostrado que la seroprevalencia varía de acuerdo a la región geográfica (**Mohanna S, 2005a**). El presente estudio es el segundo estudio llevado a cabo en el Perú y el primero realizado en donantes de sangre de zona urbana, la seroprevalencia de anticuerpos contra antígenos líticos y/o latentes de 14.0% es superior a los valores obtenidos en donantes de ciudades urbanas de Argentina, Brasil y Chile cuyas seroprevalencias oscilan entre el 2-4% (**Pérez C, 2004; Pérez C, 2006**), además, es superior a los valores obtenidos en estudios en población en general (**Souza VAUF, 2004**). El primer y único estudio llevado a cabo en población de una zona rural del Perú, Huaral, reportó una seroprevalencia del 56.25% (**Mohanna S, 2007**) que iguala a los valores reportados en población amerindia sudamericana (**Biggar R, 2000; Whitby D,**

**2004)** los que a su vez son elevados como los reportados en población africana. Es importante resaltar que a pesar de la alta seroprevalencia del HHV-8 en población amerindia sudamericana, no se han reportado casos de Sarcoma de Kaposi, lo que sugiere la presencia de cofactores necesarios para el desarrollo de éste o predisposición genética **(Mohanna S, 2005a)**.

Los ensayos que usan como sustrato antígenos líticos del HHV-8 han demostrado ser más útiles para detectar seropositivos que los que usan antígenos latentes, aunque se pueden obtener falsos positivos por reacciones cruzadas con otros herpesvirus **(Corchero JL, 2001)**, así mismo, la inmunofluorescencia es más sensible que el enzimoimmunoensayo por los múltiples antígenos presentes en la célula BCBL-1 **(Pau CP, 1998)**, y debido a que la respuesta inmune para antígenos virales varía en gran medida entre individuos, es decir, un ensayo basado en un solo antígeno carece de la sensibilidad necesaria para ser útil en tamizar grandes poblaciones heterogéneas **(Hudnall SD, 2003)**. Este estudio se basó en inmunofluorescencia indirecta, utilizando por separado como sustratos antígenos líticos y latentes, obteniéndose 6.6% y 11.1% como seroprevalencia respectivamente, lo que concluye que la inmunofluorescencia para detección de anticuerpos contra antígenos latentes, en esta población, detectó mayor cantidad de seropositivos. La inmunofluorescencia para detección de anticuerpos contra antígenos latentes ha sido más eficaz, a diferencia de muchos otros estudios, en detectar más seropositivos en población amerindia de Brasil y Ecuador **(Souza VAUF, 2007; Whitby D, 2004)**. Sin embargo, la especificidad y sensibilidad real de cada ensayo no está aún definida por la falta de una “prueba de

oro”, el considerar a pacientes con sarcoma de Kaposi como verdaderos infectados conlleva a que se sobre-estime la sensibilidad de los ensayos ya que estos pacientes presentan altos títulos de anticuerpos contra el HHV-8 (**Casper C, 2002**). Otra variación metodológica proviene de lo incierto que resulta determinar el título sérico para el tamizaje de anticuerpos contra el HHV-8. Es así que la falta de un método bien estandarizado y validado para determinar la seroprevalencia del HHV-8 conlleva a un considerable variabilidad en las seroprevalencias reportadas en diferentes poblaciones, como también el sustrato que se utiliza para cada ensayo (**Hudnall SD 2003**). Como alternativa a la ausencia de un “patrón de oro” se han utilizado patrones pseudo-oro derivados de consenso y análisis de clase latente en los que se utiliza como verdaderos negativos a individuos con bajo riesgo de infección y como verdaderos positivos a individuos con alto riesgo de infección (**Pellett PE, 2003; Nascimento MC, 2007**).

La seroprevalencia tiende a aumentar en forma directamente proporcional a la edad (**Freitas RB, 2002**), encontrándose en este estudio un pico notable en el grupo etáreo  $\geq 45$  años, también sólo en ellos se detectó mayor número de casos positivos con IFI para anticuerpos contra antígenos líticos, del mismo modo la positividad para estos anticuerpos ha tenido relación estadísticamente significativa con la edad.

Aún no se ha concluido si el HHV-8 puede ser transmitido por vía parenteral, se detectó casos de presencia de ADN del HHV-8 en donantes seropositivos (**Enbom M, 2002**), como también en otro estudio no se detectó ADN en ninguno de los donantes seropositivos (**Pellett PE, 2003**). La viremia es intermitente inclusive

en pacientes con Sarcoma de Kaposi (**Pierrotti LC, 2000**), lo que podría estar condicionando los reportes obtenidos. En estudios de seroconversión se determinó una probabilidad del 0.7% a 4.1% que tiene un receptor seronegativo para el HHV-8, de seroconvertir luego de recibir una unidad sanguínea seropositiva para el virus (**Dollard SC, 2005; Hladik W, 2006**), esta seroconversión está condicionado a la fracción de sangre recibida, siendo las fracciones de sangre con componentes celulares los que pueden representar un riesgo significativo. Los estudios de seroconversión han definido como unidad positiva para el HHV-8 los que presentaron anticuerpos contra é, lo que no implica la presencia del virus, así como la ausencia de anticuerpos no implica su ausencia.

## **VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

La transmisión del HHV-8 por transfusión sanguínea aún no puede ser completamente descartada, más aún en países con alta endemicidad y, hasta el momento, el Perú parece tener esta característica.

El Perú se caracteriza por poseer diferentes grupos étnicos y así diferentes costumbres que podrían estar vinculadas a una alta transmisión del virus, por lo tanto, es importante evaluar la seroprevalencia en diferentes grupos étnicos y a su vez asociarlo a características y costumbres propias de cada una.

Es importante que se determine la presencia de anticuerpos por más de un método con el objetivo de mejorar la sensibilidad de detección de infección.

La presencia de anticuerpos contra antígenos líticos o latentes debe ser evaluada junto con las características de la población en estudio

y de esta forma se podría determinar que caracteriza a las poblaciones que las presentan y a las que no.

Determinar la seroprevalencia es un importante dato epidemiológico, sin embargo, es necesario determinar la presencia del ADN del HHV-8 para poderlo vincular directamente a una posible transmisión por transfusión sanguínea.

El estudio de seroconversión de receptores de unidades positivas para el HHV-8 debe ser evaluada considerando la positividad del ADN del virus en cada unidad.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

Angeloni A, Masala MV, Montesu MA, Santarelli R, Satta R, Ceccherini-Nelli L, Valdivieso P, Faggioni A, Cottoni F. 2006. **Environmental Factors Influence The Rate of Human Herpesvirus Type 8 Infection in a Population with High Incidence of Classic Kaposi Sarcoma.** Clin Infect Dis 42: e66-e68.

Bejarano L, Mormontoy W, Tipacti C. 2006. **Muestreo e Inferencia Estadística en Ciencias de la Salud.** Editorial Unión - Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú. pp. 26-28.

Biggar R, Whitby D, Marshall V, Linhares A, Black F. 2000. **Human Herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: A Hyperendemic population with a new subtype.** J Infect Dis 181: 1562-1568.

Blackbourn DJ, Ambroziak J, Lennette E. 1997. **Infectious Human Herpesvirus 8 in a Healthy North American Blood Donor.** Lancet 349: 609-611.

Blajchman MA, Vamvakas EC. 2006. **The Continuing Risk of Transfusion-Transmitted Infections.** N Engl J Med 355: 1303-1305.

Cai X, Lu S, Zhang Z, Gonzalez CM, Damania B, Cullen BR. 2005. **Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Expresses an Array of Viral MicroRNAs in Latently Infected Cells.** Proc Natl Acad Sci USA 102; 15: 5570–5575.

Casper C, Krantz E, Taylor H, Dalessio J, Carell D, Wald A, Corey L, Ashley R. 2002. **Assessment of a Combined Testing Strategy for Detection of Antibodies to Human Herpesvirus 8 (HHV-8) in Persons with Kaposi's Sarcoma, Persons with Asymptomatic HHV-8 Infection, and Persons at Low Risk for HHV-8 Infection.** J Clin Microbiol 40; 10: 3822-3825.

Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. 1995. **Kaposi's Sarcoma–Associated Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Related Body-Cavity–Based Lymphomas.** N Engl J Med 332:1186-91.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. 1994. **Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma.** Science 266; 1865-1869.

Corchero JL, Mar EC, Spira TJ, Pellett PE, Inoue N. 2001. **Comparison of Serologic Assays for Detection of Antibodies against Human Herpesvirus 8.** Clin Diagn Lab Immunol 8; 5: 913-921.

Corey L, Brodie S, Huang M, Koelle DM, Wald A. 2002. **HHV-8 infection: a model for reactivation and transmission**. Rev Med Virol 12: 47-63.

Coscoy L. 2007. **Immune Evasion by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus**. Nat Immunol Rev 7; 5: 391-401.

Daniel W. 1996. **Bioestadística: base para el análisis de las Ciencias de la Salud**. Editorial Limusa. México. pp. 202-209.

Dollard SC, Nelson KE, Ness PM, Stambolis V, Kuehnert MJ, Pellett PE, Cannon MJ. 2005. **Possible Transmission of Human Herpesvirus 8 by Blood Transfusion in a Historical United States Cohort**. Transfusion 45; 500-503.

Du MQ, Bacon CM, Isaacson PG. 2007. **Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus/ Human Herpesvirus 8 and Lymphoproliferative Disorders**. J Clin Pathol 60; 1350-1357.

Edelman DC. 2005. **Human Herpesvirus 8 – A Novel Human Pathogen**. Virol J 2: 78.

Enbom M, Urassa W, Massambu C, Thorstensson R, Mhalu F, Linde A. 2002. **Detection of Human Herpesvirus 8 DNA in Serum from Blood Donors with HHV-8 Antibodies Indicates Possible Bloodborne Virus Transmission**. J Med Virol 68: 264-267.

Freitas R, Freitas M, Linhares A. 2002. **Prevalence of Human Herpesvirus 8 Antibodies in the Population of Belém, Pará, Brazil**. Rev Inst Med Trop S Paulo 44: 309-313.

Hladik W, Dollard SC, Mermin J, Fowlkes AL, Downing R, Amin MM, Banage F, Nzaro E, Kataaha P, Dondero TJ, Pellett PE, Lackritz EM. 2006. **Transmission of Human Herpesvirus 8 by Blood Transfusion.** N Engl J Med 355; 13:1331-1338.

Hudnall S. 2004. **Crazy 8: Unraveling Human Herpesvirus 8 Seroprevalence.** Clin Infect Dis 39: 1059-1061.

Hudnall SD, Chen T, Rady P, Tyring S, Allison P. 2003. **Human Herpesvirus 8 Seroprevalence and Viral Load in Healthy Adult Blood Donors.** Transfusion 43; 85-90.

Jenner RG, Boshoff C. 2002. **The Molecular Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus.** Biochimica et Biophysica Acta 1602; 1-22.

Martin JN. 2007. **Moving toward Clarity on 2 Fronts in the Epidemiology of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection.** J Infect Dis 196; 173-175.

Mohanna S, Ferrufino JC, Sanchez J, Bravo F, Gotuzzo E. 2005. **Epidemiological and Clinical Characteristics of Classic Kaposi's Sarcoma in Peru.** J Am Acad Dermatol 53: 435-441.

Mohanna S, Maco V, Bravo F, Gotuzzo E. 2005. **Epidemiology and Clinical Characteristics of Classic Kaposi's Sarcoma, Seroprevalence, and Variants of Human Herpesvirus 8 in South America: A Critical Review of an Old Disease.** Int J Infect Dis 9; 239-250.

Mohanna S, Maco V, Gown A, Morales D, Bravo F, Gotuzzo E. 2006. **Is Classic Kaposi's Sarcoma Endemic in Peru?: Report of**

**a Case in an Indigenous Patient.** Am J Trop Med Hyg 75: 324-326.

Mohanna S, Portillo JA, Carriquiry G, Vidal J, Ferrufino JC, Sanchez J, Bravo F, Gotuzzo E. 2007. **Human Herpesvirus 8 in Peruvian Blood Donors: A Population with Hyperendemic Disease?** Clin Infect Dis 44; 44: 558-561.

Nascimento MC, Souza VAUF, Sumita LM, Freire W, Munoz F, Kim J, Pannuti CS, Mayaud P. 2007. **Comparative Study of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Serological Assays Using Clinically and Serologically Defined Reference Standards and Latent Class Analysis.** J Clin Microbiol 45: 715-720.

Pau CP, Lam LL, Spira TJ, Black JB, Stewart JA, Pellett PE, Respass RA. 1998. **Mapping and Serodiagnostic Application of a Dominant Epitope within the Human Herpesvirus 8 ORF65-Encoded Protein.** J Clin Microbiol 36; 6: 1574-1577.

Pellett PE, Wright DJ, Engels EA, Ablashi DV, Dollard SC, Forghani B, Glynn SA, Goedert JJ, Jenkins FJ, Lee TH, Neipel F, Todd DS, Whitby D, Nemo GJ, Busch MP. 2003. **Multicenter Comparison of Serologic Assays and Estimation of Human Herpesvirus 8 Seroprevalence among US Blood Donors.** Transfusion 43; 1260-1268.

Pérez C, Tous M, Gallego S, Zala N, Rabinovich O, Garbiero S, Martínez MJ, Cunha AM, Camino S, Cámara A, Costa SC, Larrondo M, Francalancia V, Landreau F, Bartomioli MA. 2004. **Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Blood Donors from**

**Different Geographical Regions of Argentina, Brazil, and Chile.**  
J Med Virol 72: 661-667.

Pérez, C, Tous M, Benetucci J, Gomez J. 2006. **Correlations Between Synthetic Peptide-Based Enzyme Immunoassays and Immunofluorescence Assay for Detection of Human Herpesvirus 8 Antibodies in Different Argentine Populations.** J Med Virol 78: 806-813.

Pierrotti LC, Sumita LM, Freire WS, Caiaffa Filho HH, Souza VAUF. 2000. **Detection of Human Herpesvirus 8 DNA and Antibodies to Latent Nuclear and Lytic-Phase Antigens in Serial Samples from AIDS Patients with Kaposi's Sarcoma.** J Clin Virol 16: 247-251.

Renne R, Lagunoff M, Zhong W, Ganem D. 1996. **The Size and Conformation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) DNA in Infected Cells and Virions.** J Virol 70; 11: 8151-8154.

Rezaee SAR, Cunningham C, Davison AJ, Blackbourn DJ. 2006. **Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Immune Modulation: An Overview.** J Gen Virol 87; 1781-1804.

Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. 1996. **Nucleotide Sequence of the Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV-8).** Proc Natl Acad Sci USA 93; 25: 14862-14867.

Souza VAUF, Sumita LM, Freire W, Sato HK, Grandi JL, Pierrotti LC, Nascimento MC, Pannuti CS. 2004. **Prevalence of Antibodies**

**to Human Herpesvirus 8 in Populations with and without Risk for Infection in Sao Paulo State.** Braz J Med Biol Res 37; 1: 123-127.

Souza VAUF, Sumita LM, Nascimento MC, Oliveira J, Mascheretti M, Quiroga M, Freire WS, Tateno A, Boulos M, Mayaud P, Pannuti CS. 2007. **Human Herpesvirus-8 Infection and Oral Shedding in Amerindian and Non-Amerindian Populations in the Brazilian Amazon Region.** J Infect Dis 196: 844-852.

Teo CG. 2006. **Conceptual Emergence of Human Herpesvirus 8 as an Oral Herpesvirus.** Adv Dent Res 19: 85-90.

Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, Kron M, Ebbesen P, Biggar RJ. 2004. **Genotypic Characterization of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Asymptomatic Infected Subjects from Isolated Populations.** J Gen Virol 85; 155–163.

Wu L, Lo P, Yu X, Stoops JK, Forghani B, Zhou ZH. 2000. **Three-Dimensional Structure of the Human Herpesvirus 8 Capsid.** J Virol 74; 20: 9646-9654.

Yarchoan R. 2006. **Key Role for a Viral Lytic Gene in Kaposi's sarcoma.** N Engl J Med 355: 1383-1385.

Yu Y, Black JB, Goldsmith CS, Browning PJ, Bhalla K, Offermann MK. 1999. **Induction of Human Herpesvirus-8 DNA Replication and Transcription by Butyrate and TPA in BCBL-1 cells.** J Gen Virol 80; 83-90.

Zlotnick A. 2004. **Viruses and the physics of soft condensed matter**. Proc Natl Acad Sci USA 101; 44: 15549–15550.



## **VIII. ANEXOS**

## **ANEXO 1**

### **FICHA DE ENTREVISTA: SELECCIÓN DEL POSTULANTE A DONACIÓN DE SANGRE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**



DIRECCIÓN DE SALUD Y CENTRO MÉDICO NAVAL  
"CIRUJANO MAYOR SANTIAGO TAVARA"

SS-132 (EMI.Ago.2007)

### SELECCIÓN DEL POSTULANTE A DONACIÓN DE SANGRE

Grupo sanguíneo:  Factor Rh:  Código de Postulante:   
Fecha:  Código de Donante:   
Tipo de donación: ☐ Voluntaria ☐ Reposición ☐ Remunerada ☐ Autólogo

#### I. DATOS PERSONALES:

Nombre:	Edad: años	Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Femenino
Categoría Militar ( ) Civil ( )	Estado Civil: <input type="checkbox"/> Sol <input type="checkbox"/> Cas <input type="checkbox"/> Viu <input type="checkbox"/> Div <input type="checkbox"/> Con	
Ocupación:	Lugar y fecha de Nacimiento:	
Lugar de procedencia:	Domicilio:	
Centro de trabajo:	Teléfono casa:	Celular:
DNI / CIP:	E - mail:	

#### II. PROTOCOLO DE SELECCIÓN AL DONANTE DE SANGRE

1. ¿Ha donado sangre alguna vez?	Si ( ) No ( )		
2. ¿Donó sangre en los últimos tres meses?	Si ( ) No ( )		
3. ¿Se puso nervioso cuando donó sangre?	Si ( ) No ( )		
4. ¿Cuándo fue la última regla?			
5. ¿Cuántos días menstrúa?			
6. En su menstruación, el sangrado es: abundante ( ) moderado ( ) escaso ( )			
7. ¿Está gestando?	Si ( ) No ( )		
8. Fecha del último parto:			
9. ¿Está dando de lactar?	Si ( ) No ( )		
10. ¿Ha sido operado en los últimos seis meses?	Si ( ) No ( )		
11. ¿De qué fue operado?			
12. ¿Ha recibido sangre, trasplante de órgano o tejidos? Hace que tiempo	Si ( ) No ( )		
13. ¿Ha sido tatuado, se ha sometido a punción de piel para aretes, adornos, acupuntura o he usado drogas ilegales?	Si ( ) No ( )		
14. ¿Qué medicina está tomando actualmente? ¿Por qué?			
15. ¿Ha tenido o tiene alguna (s) de estas enfermedades o molestias?			
Hepatitis	Chagas (Rp)	Cáncer (Rp)	Dengue (1a)
Tuberculosis (5a)	Bartonelosis	Diabetes (Rp)	Fiebre Amarilla (1a)
Fiebre Tifoidea (2a)	Cardiopatías (Rp)	Asma	Amebiasis (1a)
Fiebre Malta (3a)	Hipertensión Arterial	Fiebre Reumática (Rp)	Mononucleosis
Enfermedades venéreas (3a)	Convulsiones (Rp)	Hipertiroidismo	Osteomielitis (5a)
Paludismo	Hemorragias	Trastornos de Coagulación	Glomerulonefritis
16. ¿Ha tenido contacto directo con personas que tengan hepatitis o ictericia?	Si ( ) No ( )		
17. ¿Ha viajado a zona endémica de paludismo?	Si ( ) No ( )		
18. ¿Consumo usted drogas?	Si ( ) No ( )		
19. ¿Ha recibido vacunas? Cuáles:	Si ( ) No ( )		
20. ¿Viajó fuera del país en los últimos años?	Si ( ) No ( )		
21. Pertenecer usted o ha tenido contacto sexual con grupo de riesgo? Homosexual ( ) Bisexual ( ) Promiscuo ( ) Prostituta ( ) No ( ) Otro:			
22. ¿Con cuántas personas tuvo contacto sexual en los últimos tres años?	Si ( ) No ( )		
23. ¿Tiene usted SIDA o ha tenido alguna prueba para SIDA positiva?	Si ( ) No ( )		
24. ¿Ha sido excluido como donante anteriormente? ¿Por qué?	Si ( ) No ( )		
25. ¿Ha tomado medicamentos para Psoriasis tales como Etretinato (Tegison) en los últimos 3 años?	Si ( ) No ( )		
26. ¿Ha ofrecido dinero o drogas a alguna persona para tener sexo con Ud., en los últimos 12 meses?	Si ( ) No ( )		
27. ¿Ha tomado medicamentos tales como Isotretinoína (Acutane) (Roaccutan), Finasterida (Proscar) en los últimos 4 semanas?	Si ( ) No ( )		
28. ¿Ha tomado Aspirina o algún medicamento que contenga Ácido Acetilsalicílico en los últimos 3 días?	Si ( ) No ( )		
29. ¿Está donando sangre para que le hagan las pruebas para enfermedades hemotransmisibles?	Si ( ) No ( )		
30. ¿Comprende Ud., que de estar infectado con el virus del SIDA, puede transmitirlo con su donación de sangre a pesar de tener una prueba negativa para SIDA, y a pesar de que se sienta bien de salud?	Si ( ) No ( )		
31. ¿Ha leído y entendido toda la información presentada y han sido resueltas todas sus preguntas?	Si ( ) No ( )		
32. ¿Se ha sometido a curación o extracción dental en los últimos 03 días?	Si ( ) No ( )		

Receptor:  
Nombre del Entrevistador: \_\_\_\_\_ Nombre del Postulante: \_\_\_\_\_  
Firma y Sello: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_



# EG05 - FR01: FORMATO DE SELECCIÓN DEL POSTULANTE

## III. EXAMEN CLÍNICO:

Peso:	Kg.	Talla:	m.	P.A.	mm/Hg	Pulso:	pul/ min.
-------	-----	--------	----	------	-------	--------	-----------

Estado de accesos venosos:

Observaciones:

Nombre del Examinador:

Nombre del Postulante:

Firma y Sello:

Firma:

## IV. EXAMENES COMPLEMENTARIOS:

Hematocrito:	Hb:	VDRL / RPR:	Anti VIH:
HBsAg:		Anti Core VHB:	Anti VHC:
Anti HTLV:		Anti Chagas:	Otros: Malaria Bartonella
Grupo Sanguíneo:		Factor Rh:	Variante Du:
		Fenotipo Rh:	

Nombre del Responsable:

Firma y Sello:

## V. CALIFICACIÓN DEL DONANTE

APTO

NO APTO TEMPORALMENTE

NO APTO PERMANENTE

Nombre del Calificador:

Firma y Sello:

## V. CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Yo, voluntariamente dono mi sangre y derivados a esta institución. Concedo autorización para que se obtenga la cantidad de 450 ml. de sangre y sea examinada y utilizada en la transfusión sanguínea. He tenido la oportunidad de preguntar sobre este procedimiento, y entiendo lo que es y cuales son sus riesgos y también he tenido oportunidad de rechazar que lo realicen. He revisado y entendido la información que me dieron referente a la propagación del virus del SIDA a través de donaciones de sangre, plaquetas o plasma, por lo tanto yo concuerdo que mi sangre debe ser examinada para los anticuerpos del SIDA y otras enfermedades infecciosas. En mi consentimiento yo certifico que he contestado con toda veracidad las preguntas que me realizaron. Yo por medio de la presente eximo de toda responsabilidad a esta institución y a sus miembros de cualquier reclamo o demanda que yo, mis herederos, ejecutores o administradores tengan o puedan tener en contra de cualquiera de ellos en lo que se refiere a esta donación y cualquier consecuencia como resultado directo o indirecto de ella.

Firma del Donante

Huella digital

Firma y Sello del Entrevistador

## **ANEXO 2**

### **CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR BCBL-1**

#### **INTRODUCCIÓN**

El HHV-8 ha sido detectado en dos categorías distintivas de proliferaciones linfoides, denominadas Linfoma de Efusión Primaria (PEL) y Enfermedad Multicéntrica de Castleman. El PEL es un grupo característico de Linfomas no-Hodgkin de células B que presentan características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares que lo distinguen de otros linfomas relacionados al SIDA. Se presenta en cavidades corporales como la cavidad pleural, pericárdica y/o abdominal a manera de efusiones linfomatosas, usualmente en ausencia de alguna masa tumoral identificable durante su curso clínico, por ello se denomina PEL o Linfoma en Cavidad Corporal (del inglés Body Cavity Based Lymphoma) (**Cesarman E, 1995**).

A partir de este linfoma se distinguen dos líneas celulares: BC-1 que está infectada tanto por el HHV-8 y el Virus Epstein-Barr (EBV) y la

BCBL-1 que está infectada únicamente por el HHV-8 (Yu Y, 1999). La línea celular BCBL-1 hospeda al HHV-8 en su fase latente, la infección se debe llevar a cabo en la fase de adherencia celular, en la que los receptores para este virus: integrina  $\alpha 3 \beta 1$  y sulfato de heparina, son expresados en niveles más elevados en la célula (Teo CG, 2006). La reactivación del HHV-8 es inducida in vitro por esteroides de forbol como el TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), citocinas solubles y coinfección con otros agentes virales, así se generan nuevas partículas virales, esto corresponde a la fase lítica del virus (Corey L, 2002).

## **MATERIALES**

- Cabina de Flujo Laminar Tipo II.
- Estufa a 37°C de CO<sub>2</sub>.
- Microscopio invertido.
- Frascos de cultivo celular.
- RPMI 1640
- Suero Bovino Fetal
- 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)

## **PROCEDIMIENTO**

1. El Cultivo celular fue mantenido 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina y estreptomycin en frascos de cultivo celular.
2. Cada 3 ó 4 días, el contenido de cada frasco fue dividido en dos frascos de cultivo a los que se les adicionó RPMI 1640 y suero bovino fetal al 10%, con el fin de incrementar la población celular.



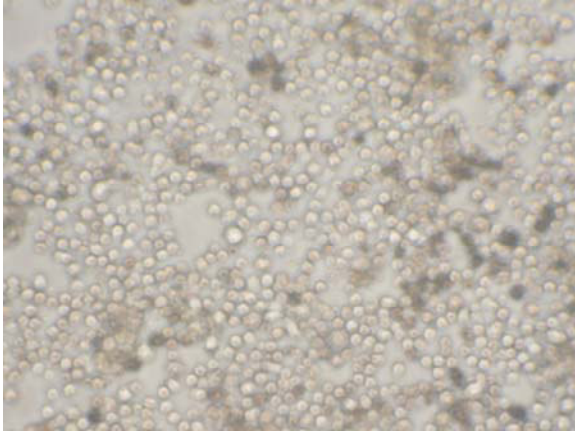
3. La viabilidad de las células en el cultivo fue evaluada adicionando un volumen de suspensión del cultivo con un volumen igual de Azul de Trypan, para luego realizar un recuento en cámara de Neubauer.
4. En microscopio invertido, se evalúa si las células BCBL-1 tienen una activa división celular o si está siendo limitada.
5. La línea celular BCBL-1 fue tratada con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) a una concentración final de 20ng/mL.
6. Se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 96 horas, protegido de la luz (**Souza VAUF, 2004**).



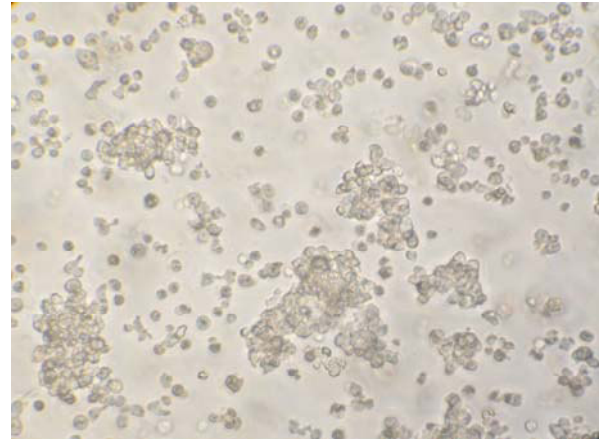
## RESULTADOS

Los cultivos celulares se observaron bajo un Microscopio Invertido, principalmente para observar la replicación celular.

Las células no viables y sin división celular activa se observaron opacas, oscuras y aisladas.



Las células viables y con elevada tasa de división celular se encontraban en racimos y eran claras a la luz.





## **ANEXO 3**

### **PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS LÍTICOS Y LATENTES DEL HHV-8**

**(Pierrotti LC, 2000; Souza VAUF, 2004)**

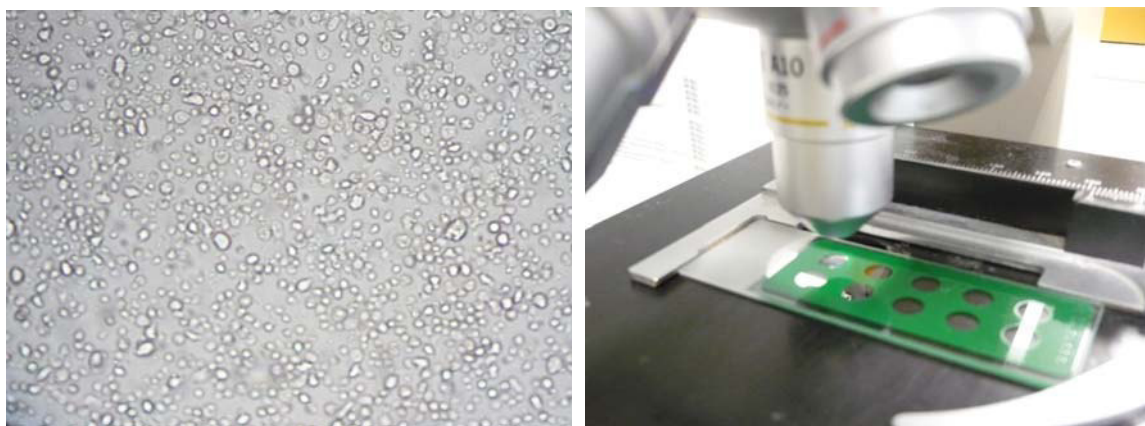
#### **MATERIALES**

- Centrífuga de 5000rpm.
- Congeladora a -20 °C.
- Cabina de Flujo Laminar Tipo II.
- Estufa a 37 °C.
- Agitador.
- Microscopio de fluorescencia.
- Micropipetas simples y multicanales.
- Puntas para micropipetas descartables.
- Láminas para inmunofluorescencia.

## PROCEDIMIENTO

### Preparación del Sustrato para la IFI

1. Las células BCBL-1 infectadas con el HHV-8, en fase latente o fase lítica, fueron utilizadas como sustrato en la Inmunofluorescencia Indirecta, ya que poseen los antígenos de una u otra fase que servirán de anclaje para los anticuerpos a ser detectados.
2. Las células BCBL-1 fueron concentradas mediante dos centrifugaciones consecutivas a 1200rpm durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente, para la segunda centrifugación se resuspendieron las células con PBS.
3. Se decantó todo el sobrenadante y se obtuvo un concentrado de células BCBL-1 como sedimento, con ayuda de un contador de células para ir verificando la concentración celular, se llevó la suspensión a una concentración final de  $10 \times 10^6$  células/mL de PBS.



4. En cada pozo de una lámina para inmunofluorescencia se adicionó 10uL de suspensión de células, las que posteriormente se dejaron secar en una cabina de flujo encendido durante una hora.

5. Las láminas con el sustrato fueron mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Prueba de IFI**

La inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra antígenos líticos y latentes del HHV-8 fue llevada a cabo bajo el mismo procedimiento.

1. Las láminas para inmunofluorescencia con el sustrato, células BCBL-1, conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  fueron fijadas en acetona a la misma temperatura por 10 minutos, y luego secadas a temperatura ambiente.
2. Como diluyente de las muestras de sueros y del control se utilizó leche descremada al 1%, pudiendo haberse utilizado alternativamente suero bovino fetal al 3%.
3. El control positivo fue evaluado a las diluciones de 1/40, 1/160, 1/640, 1/2560 y 1/10240. Cada muestra de suero sólo fue evaluada a la dilución de 1/40 al igual que el Control Negativo.
4. Se adicionó 20uL de leche descremada al 1% a cada pozo de la lámina para inmunofluorescencia conteniendo las células BCBL-1 fijadas, con el fin de hidratar a las células y bloquear los sitios inespecíficos, siendo aspirada luego de 10 minutos.
5. Se adicionó 20uL de las muestras de suero diluidas y los controles a cada pozo de las láminas y se mantuvieron a  $25^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, luego se lavaron en PBS y se dejaron secar.
6. El conjugado, Anti-IgG humano policlonal de conejo conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (Dako Denmark), fue diluido 1/40 en azul de Evans, y posteriormente se adicionó 20ul por cada pozo de la lámina. Se mantuvo a  $25^{\circ}\text{C}$  en oscuridad por 30

minutos y luego fue lavado en PBS, dejándolo secar en oscuridad posteriormente.



7. Se adicionó glicerol tamponado y se cubrió la lámina con un cubreobjetos.
8. La lectura se realizó en un Microscopio de Fluorescencia con objetivo de 40x.

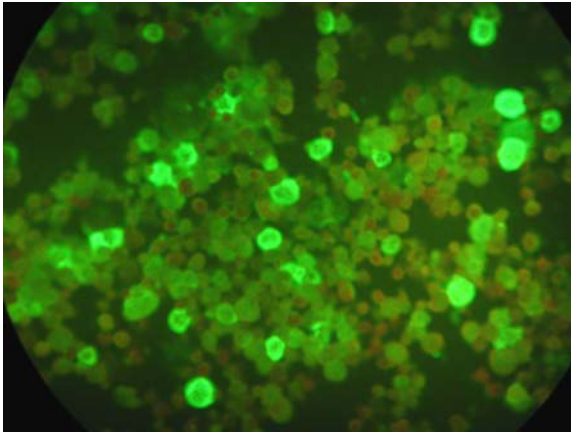


## RESULTADOS

- IFA positiva para anticuerpos contra antígenos latentes del HHV-8: Punteado nuclear fluorescente en las células BCBL-1.
- IFA positiva para anticuerpos contra antígenos líticos del HHV-8: Fluorescencia en toda la célula BCBL-1.

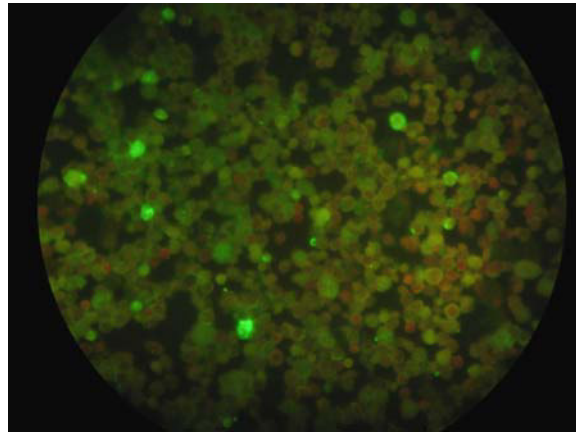
- IFA negativas para anticuerpos contra antígenos latentes o líticos del HHV-8: Células BCBL-1 de color rojo y opaco.

Positivo para anticuerpos contra  
antígenos líticos del HHV-8



Fluorescencia total de la célula  
BCBL-1

Positivo para anticuerpos contra  
antígenos latentes del HHV-8



Punteado nuclear fluorescente  
en la células BCBL-1